



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 43 24 636 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 43 24 636.2  
㉒ Anmeldetag: 22. 7. 93  
㉓ Offenlegungstag: 11. 5. 94

㉕ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 08 B 37/16**  
C 08 F 8/00  
C 08 G 77/38  
B 01 D 15/08  
C 07 B 57/00  
C 07 B 63/00  
G 01 N 27/26  
// A61K 31/515

DE 43 24 636 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

㉗ Anmelder:  
Schurig, Volker, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE

㉘ Erfinder:  
Schurig, Frank Volker, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE;  
Schleimer, Michael, Dr., Strasbourg, FR; Mayer,  
Sabine, Dr., 71229 Leonberg, DE

㉙ Herstellung und Verwendung von Chirasil-Dex als auf Trägermaterial immobilisiertes, chirales und cyclodextrinhaltiges Polymer

㉚ Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung immobilisierter, chiraler cyclodextrinhaltiger Polymere auf glatte oder poröse Oberflächen von Trägermaterialien. Die Aufgabe wird gelöst durch die Synthese eines chiralen Polymers (z. B. ein Polysiloxan), welches ein chemisch gebundenes  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrinderivat enthält. Hierbei wird das chirale, alkenylierte Cyclodextrinderivat durch platin-katalysierte Hydrosilylierung an ein Hydro-methylsiloxo-Einheiten enthaltendes Polymer chemisch gebunden. Die so erhaltenen CHIRASIL-DEX-Polymerphasen werden nach dem Aufbringen auf die poröse oder glatte Oberfläche von Trägermaterialien thermisch behandelt (z. B. 40 h bei 190°C), wodurch eine chirale Cyclodextrin-Stationärphase hoher chemischer und physikalischer Stabilität entsteht ("auf Trägermaterial immobilisiertes CHIRASIL-DEX"). Hervorgehoben ist der einfache Zugang der erfindungsge-mäß immobilisierten chiralen Cyclodextrin-Polymere, die aufgrund ihrer Eigenschaften, wie z. B. hervorragende Belegung von glatten oder porösen Oberflächen, hoher Temperaturstabilität und hoher Auswaschfestigkeit, sowohl in der Inklusions-Chromatographie (mit gasförmiger, flüssiger oder superkritischer Mobilphase), als auch in der Filtrations-, Detektions- und Sensortechnologie (z. B. in Membranen, oder als nicht-extrahierbare Oberflächenmodifikationen von Elektroden und Transistoren) eingesetzt werden. Diese Methoden finden Anwendung zum selektiven Nachweis und zur ...

DE 43 24 636 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen  
BUNDESDRUCKEREI 03. 94 408 019/328

4/45

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Immobilisierung der chiralen, cyclodextrinhaltigen Stationärphase CHIRASIL-DEX auf die Oberfläche von glatten oder porösen Trägermaterialien sowie die Verwendung der mit immobilisierten CHIRASIL-DEX-Phasen modifizierten Trägermaterialien in gepackten Säulen zur selektiven Trennung von Analyten durch chromatographische und elektrokinetische Verfahren.

In der Inklusions-Chromatographie werden chirale Cyclodextrinverbindungen entweder als Zusätze zu schwerflüchtigen Trennflüssigkeiten (z. B. Squalan oder Polysiloxane in der Gaschromatographie, GC), als Lösungen in der mobilen Phase (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, HPLC, im Umkehrphasen-Modus), oder in chemisch fixierter Form in immobilisierten Stationärphasen (GC, SFC, CE, HPLC), eingesetzt. An diesen Phasen gelingt aufgrund der schnellen und reversiblen Inklusionswechselwirkung zwischen Selektor und Selektand die chromatographische Trennung von Strukturisomeren, geometrischen Isomeren, Isotopomeren und im Falle chiraler Systeme auch die Trennung von Enantiomeren (vgl. (1-5)).

1) Schurig, V., Schmalzing, D., Mühleck, U., Jung, M., Schleimer, M., Mussche, P., Duvekot, C., Buyten, J. C., J. High Res. Chromatogr., 13 (1990), 713

2) Schmalzing, D., Jung, M., Mayer, S., Rickert, J., J. High Res. Chromatogr., 15 (1992), 723

3) Schurig, V., Schmalzing, D., Schleimer, M., Angew. Chem., 103 (1991), 994

4) Jung, M., Schurig, V., J. Microcol. Sep., 5 (1993), 11

5) Mayer, S., Schurig, V., J. Liquid Chromatogr., 16 (1993), 915.

Bedingt durch die sehr hohe Lösungskraft flüssiger bzw. überkritischer Mobilphasen und durch die oft erhöhten Analysentemperaturen bei der Verwendung gasförmiger Mobilphasen werden an die immobilisierten Stationärphasen äußerste Anforderungen in Bezug auf chemische und physikalische Stabilität gestellt. Diese wird bisher einerseits durch die Verwendung von Silicagelen erreicht, deren Oberflächen-Silanolgruppen mit entsprechend reaktiven, chiralen Molekülen modifiziert wurde, und andererseits durch den Einsatz natürlich vorkommender, chiraler Polymere (z. B. Zucker, Proteine) in derivatisierter oder nativer Form. Obwohl diese Verfahren zahlreiche Anwendungen gefunden haben, unterliegen sie teilweise gravierenden methodischen Einschränkungen (z. B. Einsatz des Trägers als Reaktionspartner, hoher und schwer kontrollierbarer Anteil nicht reagierter Oberflächen-Silanole mit der Tendenz zu silanophilen Wechselwirkungen, großporige oder nicht-poröse Trägermaterialien sind oft nicht verwendbar). Ein naheliegendes Ziel ist daher, den Selektor unabhängig von der Anwesenheit chromatographisch unerwünschter Silanolgruppen zuerst chemisch an eine fluide Matrix zu binden und dieses chirale Polymer anschließend durch Belegen auf den Träger aufzubringen.

Der vorliegenden Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, entsprechende CHIRASIL-DEX-Stationärphasen mit hoher Stabilität ohne Verlust der Selektivität auf einen Träger zu fixieren und dieses neue Verfahren für die chromatographische Trennung von Substanzen, insbesondere Enantiomere, zu verwenden.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch ge-

löst, daß ein alkenyliertes Cyclodextrinderivat durch platin-katalysierte Hydrosilylierung an ein Hydromethylsiloxo-Einheiten enthaltendes Polymer chemisch gebunden wurde. Die so erhaltene chirale Cyclodextrin-

Stationärphase wird durch Einbringen des Trägermaterials in eine Lösung des Polymers in Dichlormethan und sich anschließender langsamer Entfernung des Lösungsmittels auf den Träger belegt. Die hohe Auswaschfestigkeit der CHIRASIL-DEX-Stationärphase wird im letzten Schritt durch thermische Behandlung (typischerweise 40 Stunden bei 190°C) im Hochvakuum erreicht, wobei eine bis zu 80-prozentige Immobilisierung erzielt wird. Der Mechanismus der Immobilisierung ist noch unbekannt. Die Gegenwart zusätzlicher Hydrosilgruppen oder Spuren von Platinmetall-Katalysator scheinen jedoch den Vorgang der Quervernetzung positiv zu beeinflussen. Wird Silicagel als Trägermaterial verwendet, so kann dieses nach Extraktion der nicht immobilisierten Bestandteile mit Dichlormethan und Methanol in eine Trennsäule beliebiger Geometrie gepackt werden. Die so hergestellten gepackten Trennsäulen eignen sich zur chromatographischen Trennung von Substanzen unter Verwendung flüssiger und superkritischer Mobilphasen. Selbst unter Verwendung von Mobilphasen hoher Lösungsmittelstärke (Dichlormethan, Tetrahydrofuran) bis zu 50°C wurde kein Verlust an Stationärphase nach Elution von über eintausend Säulenvolumina beobachtet. Eine geringe Ausblutungsrate der Stationärphase ist eine unabdingbare Voraussetzung zur effektiven Kopplung der Inklusionschromatographie mit spektroskopischen Methoden in der Spurenanalytik.

Hervorzuheben ist der einfache Zugang der erfindungsgemäß mit immobilisierten, cyclodextrinhaltigen Polymeren belegten Trägermaterialien.

Die erfindungsgemäße Methode der Immobilisierung von cyclodextrinhaltigen Polymeren auf andere glatte oder poröse Oberflächen ist auch auf die in der Filtrations-, Detektions- und Sensortechnologie üblichen Trägermaterialien anwendbar. Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne diese jedoch einzuschränken.

## Beispiel 1

Zur Herstellung des olefinierten Cyclodextrinderivates werden in einem 500 ml Dreihalskolben mit Stickstoffeinlaß, Tropftrichter und Rückflußkühler mit Quecksilberventil unter Stickstoff 10 g (8,83 mmol) wasserfreies  $\beta$ -Cyclodextrin (48 h bei 60°C über Phosphorpenoxid getrocknet) in 225 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst. Dazu fügt man 1,8 g (45 mmol) pulverisierte Natriumhydroxidplättchen hinzu. Die Lösung verfärbt sich gelb. Nach einer halben Stunde starkem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung klar. Man läßt noch eine Stunde Rühren und tropft dann langsam 7,6 ml (45 mmol) 8-Brom-1-octen, gelöst in 30 ml trockenem Dimethylsulfoxid zu. Nach 48 Stunden Reaktionszeit wird von Natriumbromid und Natriumhydroxid abfiltriert und die Lösung bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol aufgenommen. Durch die langsame Zugabe von insgesamt 150 ml Diethylether entsteht ein weißlicher Niederschlag, den man schnell über einen Büchnertrichter abfiltriert. Durch Flash-Chromatographie wird von nicht alkenylierten und überalkenylierten Produkten abgetrennt (Laufmittel Toluol:Ethanol 4 : 1). Mittels Ion-Spray-Massenspektrometrie wird der Substitutionsgrad des  $\beta$ -Cyclodextrins bestimmt. Das kristalline monoalkenylierte Pro-

dukt wird bei 60°C und 0,05 Torr über Nacht getrocknet (Ausbeute: 7,1 g, 64% der Theorie). Dieses Produkt kann nun auf beliebige Weise weiter derivatisiert werden.

#### Beispiel 2

Soll beispielsweise eine Permethylierung durchgeführt werden, bringt man vorsichtig 3,0 g (125 mmol) Natriumhydrid in einen Vierhalskolben mit Stickstoffeinlaß, zwei Tropftrichtern und Rückflußkühler mit Quecksilberventil werden vorsichtig unter Stickstoff ein. Aus einem der beiden Tropftrichter wird dann vorsichtig die Hälfte einer Lösung von 3,0 g (2,4 mmol) des in Beispiel 1 beschriebenen Produktes in 100 ml wasserfreiem Dimethylformamid zugetropft (Wasserstoffentwicklung!). Danach gibt man über den zweiten Tropftrichter die Hälfte von 11,8 ml Methyljodid (188 mmol) so langsam zu, daß die Temperatur 20°C nicht überschreitet. Nach einstündigem Rühren werden in obiger Reihenfolge die restlichen Lösungen zugetropft. Nach einer weiteren Stunde wird die Reaktionsmischung langsam auf 300 ml Eiswasser gegossen. Die wäßrige Lösung wird dreimal mit je 100 ml Diethylether ausgeschüttelt und die vereinigten Diethyletherphasen dreimal mit je 20 ml Wasser rückextrahiert, um den größten Teil des Dimethylformamid zu entfernen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel einrotiert. Es entsteht ein gelblicher Feststoff. Von untermethylierten Cyclodextrinderivaten wird durch Flash-Chromatographie (Laufmittel Toluol : Ethanol 4 : 1) gereinigt.

Das Produkt wird über Nacht bei 60°C und 0,05 Torr getrocknet (Ausbeute: 1,3 g, 44 % der Theorie).

#### Beispiel 3

Die Darstellung des chiralen Polysiloxans erfolgt aus Hydromethylpolysiloxan, an welches durch Platin-katalysierte Hydrosilylierung in einer polymeranalogen Reaktion das ungesättigte  $\beta$ -Diketon chemisch angebunden wird. Das Hydromethylpolysiloxan enthält z. B. bis zu 25% Hydromethyldisiloxy-Einheiten bei Molekulargewichten bis zu 15000. Die chemische Struktur der Substituenten der restlichen Monomereinheiten des Hydromethylpolysiloxans kann dabei in weiten Grenzen variiert werden (z. B. Alkyl, Aryl, Perfluorierte Reste, ionische Gruppen). Die Verwendung von Blockpolymeren oder smektischen Phasen mit Hydromethylsiloxy-Monomereinheiten ist ebenfalls möglich.

Erfindungsgemäß werden in einer typischen Synthese zum Beispiel 3 g (1 mmol) (5%) Hydromethyl- (95%) Dimethylpolysiloxan (MW etwa 3000) und 0,72 g des im Beispiel 2 beschriebenen Permethyl-Monokis-6-(okt-7-enyl)- $\beta$ -cyclodextrin (ca 0,5 mmol), gelöst in 100 ml absolutem Toluol, in einen 250 ml Dreihalskolben mit Stickstoffeinlaß, Tropftrichter und Rückflußkühler mit Quecksilberventil eingebracht und unter Rückfluß erhitzt. Man gibt dann 1 ml einer etwa 0,1%igen Lösung von Hexachloroplatin(IV)säure-hexahydrat in absolutem Tetrahydrofuran (etwa 0,5 mg in 5 ml) zur siedenden Lösung. Nach einer Stunde wird noch 1 ml der Katalysatorlösung dazugegeben und dann die Reaktionslösung 24 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach Abrotieren des Toluols wird der Rückstand in 50 ml wasserfreiem Methanol aufgenommen, die Lösung etwas gerührt und dann abdekantiert, um von unumgesetztem Cyclodextrin zu befreien. Der Rückstand wird in 10 ml n-Pentan aufgenommen, dazu gibt man tropfenweise Methanol,

bis sich erste katalysatorhaltige Siloxantropfen bilden. Man dekantiert ab und rotiert die Methanol/n-Pentan Lösung ein. Dieser Vorgang wird wiederholt, falls nach dem Einrotieren kein durchsichtiges Polysiloxan entstanden ist. Das zähflüssige, manchmal leicht bräunliche Polysiloxan wird über Nacht bei 60°C und 0,05 Torr getrocknet (Ausbeute: 1,3 g, 34% der Theorie).

#### Beispiel 4

Zur erfindungsgemäßen Herstellung von Trägermaterialien, die mit immobilisierten CHIRASIL-DEX-Stationärphasen belegt sind, löst man entsprechend der gewünschten Filmdicke eine bestimmte Menge z. B. des nach Beispiel 3 erhaltenen Polymers in trockenem Dichlormethan (1 : 20 w/v) und schlemmt dieses mit 4 g Silicagel (z. B. 5  $\mu$ m, 300 Å Porengröße), welches vorher durch azeotrope Destillation mit Toluol getrocknet wurde, im Ultraschallbad auf. Danach wird das Lösungsmittel langsam am Rotationsverdampfer abgezogen und das rieselfähige, nicht verklebte mit CHIRASIL-B-DEX belegte Silicagel im Hochvakuum 48 Stunden lang auf 190°C erhitzt. Nicht immobilisiertes CHIRASIL-DEX wird mit je 200 ml Methanol, Dichlormethan und Diethylether extrahiert. Zur Berechnung des Immobilisierungsgrades wurde der prozentuale Gehalt von Kohlenstoff und Wasserstoff, bestimmt mittels Elementaranalyse, vor und nach dem Waschen des mit immobilisiertem CHIRASIL-DEX belegten Silicagel mit den Lösungsmitteln benutzt. Die Immobilisierungsraten betragen 70–80%.

Mit diesem Material werden z. B. 10 oder 25 cm lange HPLC-Säulen (4,6 mm Innendurchmesser) nach konventionellen Methoden im Slurry-Verfahren gepackt. Die HPLC-Säulen werden zunächst mit Methanol, Methanol/Wasser (1 : 1, v/v) und Wasser gespült. Die weitere Konditionierung erfolgt mit dem jeweiligen Puffersystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, bis eine stabile Basislinie zu beobachten ist. Die Säulen werden vor Aufbewahrung zuerst mit Methanol/Wasser (80/20, v/v) und danach mit Methanol gespült.

#### Beispiel 5

An einer nach Beispiel 4 aus 1,8 g mit immobilisiertem CHIRASIL-DEX belegtem Silicagel (20%, w/w) hergestellten 10 cm  $\times$  4,6 mm ID Gepacktsäule gelingt z. B. die selektive Trennung der Enantiomere von Hexobarbital (s. Abb. 1) unter Verwendung eines 20 mM Borat/Phosphat Puffers (pH 7,1 ml/min), welcher mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln modifiziert wurde. Die Auflösung der Peaks der getrennten Enantiomere nimmt mit sinkender Konzentration und steigender Polarität des Modifiers stark zu. In Abb. 1 auf der linken Seite wurde Methanol als Modifier in unterschiedlichen Konzentrationen benutzt. Die Auflösung der Peaks steigt mit sinkender Methanolkonzentration. Wird anstelle von Methanol Acetonitril verwendet, verschlechtert sich die Auflösung der Enantiomere erheblich.

#### Patentansprüche

1. Cyclodextrinhaltige Polymere (z. B. Polysiloxane, Blockpolymere oder smektische Phasen), bei denen ein chirales Cyclodextrinderivat chemisch an eine Polymerkette gebunden ist, und die auf glatte oder poröse Oberflächen von Trägermaterialien immobilisiert werden (immobilisiertes CHIRASIL-DEX).

2. Immobilisierte cyclodextrinhaltige Polymere nach Anspruch 1, die als chirale Cyclodextrinkomponente  $\alpha$ -,  $\beta$ -, oder  $\gamma$ -Cyclodextrindenvate enthalten.
3. Immobilisierte cyclodextrinhaltige Polymere nach Anspruch 1 und 2, welche aus Cyclodextrinderivaten von  $\alpha$ -,  $\beta$ -, oder  $\gamma$ -Cyclodextrin hergestellt wurden, die eine endständige Doppelbindung enthalten. Die verbleibenden Alkoholfunktionen des jeweils verwendeten olefinierten Cyclodextrins werden entweder in unveränderter Form oder nach beliebiger chemischer Veränderung (z. B. Alkylierung, Acylierung, Carbamoylierung, Si-lylierung) eingesetzt.
4. Immobilisierte, chirale Polymere nach Anspruch 1—3, welche durch Hydrosilylierung an ein Hydromethylsiloxo-Einheiten-enthaltendes Polymer chemisch gebunden werden.
5. Chirale cyclodextrinhaltige Polymere nach Anspruch 1—4, die durch thermische Behandlung auf die glatte oder poröse Oberfläche von Trägermaterialien (z. B. Silicagel), wie sie allgemein in der selektiven Auftrennung, Detektion und Sensorik von Substanzen Verwendung finden, immobilisiert wurden.
6. Verfahren zur chromatographischen Trennung von Isomeren, Isotopomeren und insbesondere von Enantiomeren sowie komplexen Gemischen von Wirkstoffen (z. B. Pheromonen, Aromen, Geruchsstoffen, Narkotika) durch Einbringen der in Anspruch 1—4 beschriebenen, mit chiralen cyclodextrinhaltigen Polymeren modifizierten Trägermaterialien als Stationärphasen in Trennsäulen unter Verwendung einer flüssigen oder überkritischen Mobilphase.
7. Verfahren zur Trennung von Isomeren, Isotopomeren und insbesondere von Enantiomeren sowie von komplexen Gemischen durch elektroosmotische Chromatographie, sowie der Ultra- bzw. Hyperfiltration, bei denen immobilisierte bzw. nicht-extrahierbare, chirale Cyclodextrinpolymere nach Anspruch 1—5 unter vorheriger Aufbringung auf ein Trägermaterial eingesetzt werden.
8. Verfahren zur selektiven Detektion von Isomeren, Isotopomeren und insbesondere von Enantiomeren sowie von komplexen Gemischen, bei denen nicht-extrahierbare, chirale Cyclodextrinpolymere nach Anspruch 1—5 unter vorheriger Aufbringung auf einen Träger (z. B. Elektroden- oder Transistoroberfläche), eingesetzt werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Abb. 1:

